



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
学位記番号	第 1008 号
氏 名	守時 良演
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Expression profiling of microRNAs in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1</p> <p>（停留精巣における microRNA の発現解析；miR-135a は FoxO1 を介して精子幹細胞の維持に関与する）</p> <p>The Journal of Urology (in the press). Accepted 28 October 2013, published online 01 November 2013.</p>
論文審査担当者	<p>主査： 鵜川 眞也</p> <p>副査： 中西 真，郡 健二郎</p>

## 論文内容の要旨

【背景・目的】 停留精巣は男性不妊の主要な原因疾患であり、最も頻度の高い先天性疾患の1つである。これまで、停留精巣患児の精巣組織とその後の精液検査の結果から、精子幹細胞数の減少が精子数の減少と強く相関していることが明らかとなっている。またモデル動物を用い、ラット停留精巣では活性型の精子幹細胞数が減少することを私たちは明らかにした。一方、タンパク発現の主要な制御因子の1つである microRNA (miRNA)は、相補的配列をもつ mRNA の分解・翻訳抑制により様々な生物学的機能を制御している。精子形成においても miRNA は必須とされているが、精子幹細胞に関する報告は少ない。そこで私たちは、停留精巣を正常精巣と比較することで、精子幹細胞の維持に関与する miRNA と、その標的 mRNA の同定・機能解析を行うこととした。

【方法】 妊娠 14 日の S-D ラットに、抗アンドロゲン剤である flutamide 7.5mg/body を腹腔内投与して停留精巣モデルラットを得た。非活性型から活性型精子幹細胞への分化が認められる生後 9 日目で、同一個体の正常精巣と停留精巣における精子幹細胞の miRNA の発現を、マイクロアレイで比較した。発現差を認めた miRNA の再現性を定量 RT-PCR で確認するとともに、精巣内における局在を In situ hybridization (ISH) で評価した。また、複数の予測プログラム (Target Scan, miRanda) を用いて、miRNA の標的 mRNA の候補を検討した。さらに in vitro において miRNA が標的 mRNA を抑制するかどうかを、レポーターアッセイおよびトランスフェクションにより検討した。

【結果】 プロファイリング解析により停留精巣で発現低下する miRNA として miR-135a を、亢進する遺伝子として miR-135a, -22-5p, -376b-3p, -7a-1-3p, -742 をそれぞれ同定した。定量 RT-PCR では、miR-135a のみで有意な再現性を確認した。正常臓器の定量 RT-PCR では、他臓器 (胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓) と比較して精巣での miR-135a の発現が 8.3~21.3 倍に亢進しており、精巣での ISH では精子幹細胞に発現を認めた。予測プログラムから、miR-135a の標的として 40 の mRNA を候補として挙げ、私たちはその中でも幹細胞維持に必須とされる FoxO1 (forehead box O1) に着目した。FoxO1 は、mRNA の 3' 側に miR-135a に対する相補配列を有し、レポーターアッセイにより miR-135a が FoxO1 の発現は抑制された。また精原細胞の培養細胞株に対してトランスフェクションした miR-135a は、FoxO1 の発現を mRNA, タンパクレベルともに抑制していた。in vivo では、FoxO1 の発現は精子幹細胞に局限しており、停留精巣で活性型 FoxO1 陽性の精子幹細胞の割合が減少していた。

【考察】 今回私たちは疾患モデルを用いて、精子幹細胞の維持に関与する miRNA として miR-135a に着目した。miR-135a はマウス胚性幹細胞の分化に関与する可能性が報告されているが、その機能や標的遺伝子は不明である。今回私たちは予測プログラムから、miR-135a の標的遺伝子として FoxO1 に着目し、in vitro で miR-135a が FoxO1 を抑制する作用があることを確認した。また in vivo でも、miR-135a と FoxO1 の発現が精子幹細胞に局限しており、さらに発現量が逆相関することを示した。以上と文献的考察から、精子幹細胞の維持に重要と考えられる FoxO1 の発現調節の一部を miR-135a が担っており、FoxO1 陽性の精子幹細胞数の減少が停留精巣における不妊症の原因の1つである可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

【背景・目的】 停留精巣は男性不妊の主要な原因疾患であり、最も頻度の高い先天性疾患の一つである。停留精巣患児の精巣組織とその後の精液検査の結果から、精子幹細胞数の減少が精子数の減少と強く相関していることが知られているが、私たちは、ラット停留精巣モデル動物を用いた解析より、特に活性型の精子幹細胞数が減少していることを明らかにした。一方、タンパク質発現を制御する microRNA (miRNA) は、相補的配列をもつ mRNA の分解・翻訳抑制により様々な生物学的活性を有している。精子形成においても miRNA は必須とされているが、精子幹細胞に関する報告は少ない。そこで私たちは、停留精巣を正常精巣と比較することで、精子幹細胞の維持に関与する miRNA の同定と機能解析を試みた。

【方法】 妊娠 14 日の S-D ラットに、抗アンドロゲン剤である flutamide 7.5 mg/body を腹腔内投与し、片側性の停留精巣モデルラットを得た。非活性型から活性型精子幹細胞への分化が認められる生後 9 日目で、正常精巣と停留精巣に存在する精子幹細胞 miRNA の発現プロファイルをマイクロアレイで解析し、比較・検討を行った。発現差を認めた miRNA の再現性を定量 PCR で確認するとともに、精巣内における局在を in situ hybridization で評価した。また、Target Scan などの複数の予測プログラムを用いて、標的 mRNA の候補を検索した。さらに in vitro において miRNA が標的 mRNA を抑制するかどうかについて、レポーターアッセイおよびトランスフェクションにより検討した。

【結果および考察】 プロファイリング解析により、停留精巣で発現が亢進する遺伝子として miR-135a, -22-5p, -376b-3p, -7a-1-3p, -742 を同定した。定量 PCR では、miR-135a のみ、有意な再現性が得られた。そこで、同手法を用いて、miR-135a の発現を臓器間で比較したところ、精巣における発現量は他臓器（胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓）と比べ 8.3~21.3 倍と非常に高いことがわかった。また、ISH の結果より、miR-135a は精子幹細胞に局在していることも明らかになった。予測プログラムから miR-135a の標的候補として 40 種類の mRNA が挙げられたが、その中でも私たちは、3' 側に miR-135a に対する相補配列を持ち幹細胞維持に必須とされる転写因子 FoxO1 (forehead box O1) に着目した。レポーターアッセイを行ったところ、miR-135a は FoxO1 の発現を抑制した。また精原細胞の培養細胞株に対して miR-135a をトランスフェクションしたところ、FoxO1 の発現は mRNA、タンパク質レベルで抑制された。さらに in vivo では、停留精巣において活性型 FoxO1 陽性精子幹細胞の割合が減少していた。これらの結果は、FoxO1 の発現調節の一部を miR-135a が担っており、FoxO1 陽性精子幹細胞数の減少が停留精巣における不妊症の発症に関与する可能性を示唆するものである。

【審査委員会】 始めに主査から「複数存在する標的遺伝子のなかで FoxO1 にのみ着目した理由は何か」など 10 項目の質問、次に第一副査から「組織切片上で、FoxO1 陽性細胞が精子幹細胞であると決定した理由は何か？」など 12 項目の質問があった。また、指導教授である第二副査から「停留精巣の分類」「不妊の頻度」など主科目を中心に数項目の質問があった。いずれの質問に対しても概ね良好な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野（泌尿器科学）に関する知識も習得しているものと判断された。よって本論文の著者には、博士（医学）の学位を授与するに値すると判断した。